

艾可胶囊的澄清工艺优选

黄燕*, 沈小苹, 潘旭东

(福建中医药大学附属人民医院, 福州 350004)

[摘要] **目的:** 优选壳聚糖用于澄清艾可胶囊提取液的工艺。**方法:** 以芍药苷、柴胡皂苷 a 的含量和浸膏得率为综合评价指标, 选择药液比、壳聚糖加入量、搅拌温度、搅拌时间为考察因素, 采用正交试验优选艾可胶囊的澄清工艺。**结果:** 艾可胶囊提取液的最佳澄清工艺为药液比 1:5, 搅拌时间 10 min, 温度 60 °C, 每 100 mL 药液加入壳聚糖 14 mL。**结论:** 优选的工艺芍药苷、柴胡皂苷 a 的提取率高、稳定性好、成本低, 适合于艾可胶囊的临床开发。

[关键词] 壳聚糖; 芍药苷; 柴胡皂苷 a; 精制工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0058-04

Optimization of Clarification Process for Aike Capsule

HUANG Yan*, SHEN Xiao-ping, PAN Xu-dong

(Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize clarification process for extract of Aike capsule by chitosan. **Method:** With the content of paeoniflorin, saikosaponin-a and extract yield as comprehensive evaluation index, solid-liquid ratio, the amount of chitosan, stirring temperature and stirring time were selected as factors, orthogonal test was carried out to optimize clarification process of Aike capsule. **Result:** Optimum clarification process of Aike capsule extract was: solid-liquid ratio 1:5, stirring time 10 min at 60 °C, added chitosan 14 mL per 100 mL extraction solution. **Conclusion:** This optimized process had advantages of good stability, low cost and high extraction rate of paeoniflorin and saikosaponin-a, it was suitable for clinical development of Aike capsule.

[Key words] chitosan; paeoniflorin; saikosapoin-a; refining process

艾可合剂是福建中医药大学附属人民医院院内制剂(批准文号闽药制字 206106045), 由白芍、柴胡、枳壳、乌药等 6 味药材组成, 具有疏肝理气、柔肝止痛等功效, 临床用于治疗慢性前列腺炎, 疗效良好^[1]。该制剂的生产工艺较简单、口味不佳、病人依从性差。本试验拟将合剂改为胶囊剂, 以壳聚糖

为澄清剂, 采用正交试验, 以芍药苷、柴胡皂苷 a 的含量和浸膏得率为指标, 优选艾可胶囊提取液的澄清工艺, 为工业生产提供参考。

1 材料

80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂), CPA-225D 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公

[收稿日期] 20120726(006)

[通讯作者] * 黄燕, 学士, 主管药师, 从事中药制剂与药品检验研究, Tel: 13859056159, E-mail: huangyanxp@163.com

[5] 赵文红, 赵翊, 白卫东, 等. 柿叶黄酮化合物提取工艺研究[J]. 陕西科技大学学报 2007, 25(5): 54.

[6] 王汉卿, 王文苹, 闫津金, 等. 超声提取枸杞叶中总黄酮提取工艺及其不同采收期含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 44.

[7] 倪帆呈, 刘增辉, 于楠楠, 等. 超声波辅助提取槐角总

黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 23.

[8] 梅林, 梅兰, 李随丽. 正交试验法优化金银花中绿原酸的水提工艺[J]. 中国药业, 2007, 16(6): 42

[责任编辑 全燕]

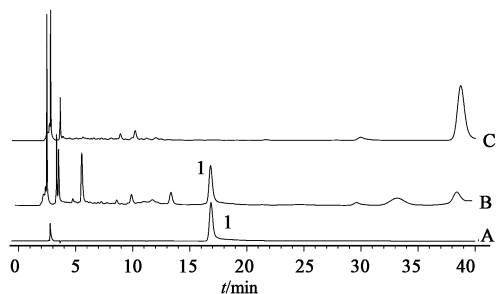
司),DZF-6050型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),ULitMate-3000型高效液相色谱仪(德国戴安仪器有限公司)。

芍药苷、柴胡皂苷 a 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110736-200933,110777-200507),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。柴胡、白芍、甘草等药材均购自福建省药材有限公司,经本院副主任中药师陈豪鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 35 °C,流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm,进样量 10 μL^[2],见图 1。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性对照;1. 芍药苷

图 1 艾可胶囊澄清液芍药苷含量测定 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 10.19 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液;精密吸取对照品贮备液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取艾可胶囊澄清液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 分别精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件分别测定 2 次,以芍药苷进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0899X - 0.5069$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.326 ~ 2.446 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取芍药苷对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,峰面积 RSD 0.93%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取艾可胶囊澄清液,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 1, 4, 8, 12, 24 h

进样 10 μL,按上述色谱条件测定芍药苷含量,计算 RSD 1.36%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取艾可胶囊澄清液 6 份,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,平行测定 6 份,测定芍药苷含量,计算 RSD 0.70%,表明该方法的重复性良好。

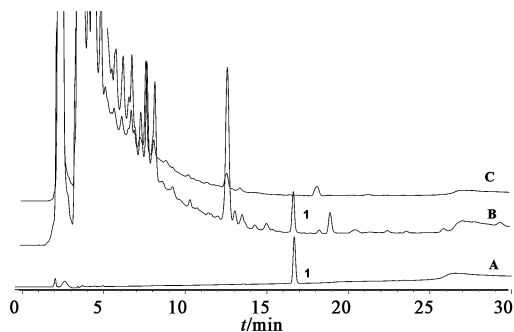
2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知质量浓度的艾可胶囊澄清液 6 份,各 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,精密吸取 1 mL 置 5 mL 量瓶中,各精密加入 3 mL 对照品溶液,加甲醇稀释至刻度,摇匀。进样 10 μL,计算回收率,结果见表 1。

表 1 艾可胶囊澄清液中芍药苷加样回收率试验

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
0.250 08	0.244 56	0.483 46	97.74	97.70	1.12
0.249 28	0.244 56	0.485 00	98.21		
0.250 44	0.244 56	0.492 67	99.53		
0.250 08	0.244 56	0.478 61	96.76		
0.249 28	0.244 56	0.476 96	96.38		
0.250 44	0.244 56	0.482 92	97.59		

2.2 柴胡皂苷 a 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 30% ~ 45% A; 12 ~ 30 min, 45% ~ 60% A; 30 ~ 35 min, 60% ~ 80% A; 35 ~ 40 min, 80% ~ 30% A; 40 ~ 45 min, 30% A)。流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,进样量 20 μL^[3-5],见图 2。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性;1. 柴胡皂苷 a

图 2 艾可胶囊澄清液柴胡皂苷 a 含量测定 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a 对照品 9.7 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液;精密吸取对照品贮备液 2 mL 置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备^[6] 精密量取艾可胶囊澄清液 15 mL,用石油醚和乙酸乙酯各振摇提取 2 次,每次 20 mL,弃去石油醚和乙酸乙酯层,水层用浓氨水调 pH 11 左右;用水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和水溶液 30 mL 洗涤,水液弃去,正丁醇液置水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解,定量转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 5,10,15,20,25,30 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件分别测定 2 次,以柴胡皂苷 a 进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.1130X - 0.0111$ ($r = 0.9999$),线性范围 0.388 ~ 2.328 μg 。

2.2.5 精密度试验 精密吸取柴胡皂苷 a 对照品溶液 20 μL ,重复进样 6 次,峰面积 RSD 1.17%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取艾可胶囊澄清液,按 2.2.3 项下方法制备柴胡皂苷 a 供试品溶液,分别于 0,1,4,8,12,24 h 各进样 10 μL ,按上述色谱条件测定柴胡皂苷 a 含量,计算 RSD 1.45%,表明供试品溶液 24 h 内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取艾可胶囊澄清液 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,平行测定 6 次,结果柴胡皂苷 a 含量 RSD 1.64%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率实验 精密量取已知质量浓度的艾可胶囊澄清液 6 份,各 8 mL,加入 2 mL 对照品溶液至分液漏斗中。用石油醚和乙酸乙酯各振摇提取 2 次,每次 15 mL,弃去石油醚和乙酸乙酯层,水层用浓氨水调 pH 10 左右;用正丁醇水饱和溶液振摇提取 3 次,每次 15 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和水溶液 25 mL 洗涤,水液弃去,正丁醇液置水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解,定量转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,进样 20 μL ,计算回收率,结果见表 2。

2.3 壳聚糖溶液的制备 用 1% 乙酸溶液配制 1% 壳聚糖溶液,室温充分溶胀后立即使用,以免壳聚糖在稀酸中缓慢水解而影响絮凝效果。

2.4 浸膏得率 取正交试验中滤液 50 mL,水浴蒸干,置真空干燥箱 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 72 h,计算浸膏得率。

2.5 澄清工艺优选 以提取液中柴胡皂苷 a,芍药苷含量和浸膏得率的综合评分为指标,选择药液比、

表 2 艾可胶囊澄清液中柴胡皂苷 a 加样回收率试验

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回 收率/%	平均回 收率/%	RSD /%
0.209 78	0.398	0.599 51	98.64	97.64	1.20
0.249 28	0.398	0.622 74	96.21		
0.200 44	0.398	0.593 83	99.23		
0.209 78	0.398	0.594 17	97.76		
0.249 28	0.398	0.623 85	96.38		
0.200 44	0.398	0.584 02	97.59		

壳聚糖加入量(每 100 mL 药液中加入量)、搅拌温度、搅拌时间为考察因素,每个因素选 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排你试验^[7-8],因素水平表见表 3。按艾可合剂 100 mL 处方量称取药材,共 9 份,进行提取^[9],提取液过滤,合并滤液,分别浓缩至药液比 1:3,1:4,1:5。按表 4 安排进行澄清工艺,絮凝液室温放置 24 h,滤过,滤液浓缩至 100 mL,备用。芍药苷、柴胡皂苷 a 含量和浸膏得率权重系数分别为 0.4,0.4,0.2,满分为 100^[9]。试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5。

$$a = \frac{\text{芍药苷含量}}{\text{芍药苷含量最大值}} \times 100;$$

$$b = \frac{\text{柴胡皂苷 a 含量}}{\text{柴胡皂苷 a 含量最大值}} \times 100;$$

$$c = \frac{\text{最小浸膏得率}}{\text{浸膏得率}} \times 100;$$

$$\text{综合评分}(X) = 0.4a + 0.4b + 0.2c。$$

表 3 艾可胶囊澄清工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	药液比	壳聚糖加入量 /mL	搅拌温度 / $^{\circ}\text{C}$	搅拌时间 /min
1	1:3	14	20	10
2	1:4	18	40	20
3	1:5	22	60	30

由表 4 可知,影响壳聚糖澄清工艺的因素顺序为 $A > D > B > C$;以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,表明 A 因素对澄清工艺有显著性差异,其他因素均无显著影响,确定最佳澄清工艺为 $A_3D_1B_1C_3$,即药液比 1:5,搅拌时间 10 min,温度 60 $^{\circ}\text{C}$,壳聚糖加入量为每 100 mL 药液加入 14 mL。

2.6 验证试验 称取处方量药材进行提取,提取液按上述优选的澄清工艺进行 3 次验证试验,结果浸膏得率分别为 18.32%,18.34%,18.18%;芍药苷质量浓度依次为 6.572,6.683,6.715 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;柴胡皂苷 a 质量浓度分别为 28.222,27.693,28.383 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;说明该工艺稳定可行。

表4 艾可胶囊澄清工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	芍药苷 /g·L ⁻¹	柴胡皂苷 a /mg·L ⁻¹	浸膏得率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	6.334	22.015	18.90	88.362
2	1	2	2	2	6.253	20.926	18.99	86.132
3	1	3	3	3	6.232	20.679	19.36	85.316
4	2	1	2	3	6.415	24.879	18.31	93.766
5	2	2	3	1	6.313	24.693	15.92	95.48
6	2	3	1	2	6.261	25.389	18.07	93.858
7	3	1	3	2	6.562	26.203	18.80	96.216
8	3	2	1	3	6.582	23.116	18.02	92.354
9	3	3	2	1	6.684	23.520	17.04	94.846
K ₁	86.603	92.781	91.525	92.896				
K ₂	94.368	91.322	91.581	92.069				
K ₃	94.472	91.340	92.337	90.479				
R	7.869	1.459	0.812	2.417				

3 讨论

芍药苷含量测定时,曾采用流动相甲醇-水(37:63),发现芍药苷色谱峰与其他成分峰分不开,且拖尾较严重,之后通过更改流动相为乙腈-1%磷酸水溶液(14:86),芍药苷色谱峰与其他成分峰完全分离,峰型较好。

表5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	122.217	2	98.961	<0.05
B	4.207	2	3.406	>0.05
C(误差)	1.235	2	1.00	
D	9.056	2	7.333	>0.05

注: $F_{0.1}(2,2) = 9.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

目前,中药制剂常用的精制方法有壳聚糖絮凝澄清、高速离心、醇沉、超滤、大孔树脂法等,其中醇沉法最为常用,但成本较高,而壳聚糖絮凝澄清法成本低廉、操作工艺简单、澄清效果较好,对艾可胶囊中白芍、柴胡等中药有效成分的保留效果优于醇沉法,因此可代替醇沉法,用于医院制剂的开发。

[参考文献]

[1] 张敏建,郭军. 疏肝理气法治疗非细菌性前列腺炎的临床研究[J]. 中华男科学,2002,8(1):76.

- [2] 刘文启. HPLC法测定肝舒合剂中芍药苷含量[J]. 齐鲁药事,2011,30(1):15.
- [3] 刘青春,赵军宁,鄢良春,等. HPLC同时测定小柴胡汤中5种有效成分[J]. 中国中药杂志,2010,35(6):708.
- [4] 杨爱霞,张长弓,付琴琴. HPLC法测定退热解毒灵颗粒柴胡皂苷a的含量[J]. 中国药师,2007,10(6):79.
- [5] 郭春,沈卫阳. HPLC-ELSD法同时测定复方柴术片中柴胡皂苷a、芍药苷与甘草酸的含量[J]. 中国新药杂志,2009,18(15):1464.
- [6] 潘旭东,黄燕,林滔,等. 艾可合剂质量标准研究[J]. 海峡药学,2010,22(6):65.
- [7] 蒋敏,夏新华. 壳聚糖用于湘A-2号颗粒的絮凝工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(16):33.
- [8] 贾永艳,祝侠丽,陈波,等. 正交试验优选蜂病康合剂壳聚糖纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):32.
- [9] 黄燕,潘旭东,沈小苹,等. 艾可合剂提取工艺研究[J]. 海峡药学,2009,21(11):20.
- [9] 卜水,林庆华,邓红,等. 正交试验优化“柴胡-白芍”药对提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):20.

[责任编辑 全燕]